| Revue suisse Zool. | Tome 84 | Fasc. 2 | p. 301-308 | Genève, juin 1977 |
| --- | --- | --- | --- | --- |

# L'expansion périphérique du blastoderme et la formation de l'aire vasculaire chez l'embryon du poulet [1]

par

**J. GALLERA**

Abstract

The experiments were performed on chick blastoderms cultured *in vitro*. They consisted in cutting-down of the posterior segment of the *area opaca*. The border of the section was either hold in place by a piece of millipore filter or completely detached from the vitelline membrane. The experiments were performed at the stage 4 and the blastoderms were fixed 21 or 23 hours latter.

The statistical analysis of the operated and the control blastoderms allows to conclude that the peripheral growth of the blastoderm, its form and that of the *area vasculosa* are determined by the vectorial distribution of the horizontal tension in the ectoblast. The tension of the over-layer is due to the adherence of the margin of over-growth to the vitelline membrane and to the creeping movement of those cells on the surface of this membrane.

## INTRODUCTION

L'expansion périphérique du blastoderme est due à l'adhérence de son bord d'enveloppement à la membrane vitelline qui doit être légèrement tendue (New 1955, 1959). Le long du pourtour du blastoderme l'ectoblaste forme un bourrelet dont les cellules sont fortement serrées et très riches en substances basophiles, notamment en RNA (Gallera & Oprecht 1948). Leurs prolongements lamelliformes glissent sur la membrane et étirent le blastoderme entier (Bellairs 1963, Bellairs & al. 1969). Le décollement partiel du bord d'enveloppement, même sur une étendue restreinte, provoque le rétrécissement de la région correspondante du blastoderme qui prend alors la forme d'une ellipse ou même d'un mince croissant. Dans ce cas, l'aire vasculaire subit les modifications analogues. Ces observations, recueillies opportunément au cours de nos expériences plus anciennes, nous ont incité à chercher une relation directe entre l'étalement du mésoblaste extra-embryonnaire et la répartition vectorielle des tensions horizontales

[1] Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

dans le blastoderme en expansion. Grâce à de simples interventions micro-chirurgicales nous avons pu modifier d'une façon voulue l'accroissement du blastoderme, même dans les cas où nous avons empêché son rétrécissement secondaire.

Le mesurage minutieux des blastodermes opérés et de leurs témoins nous a permis de préciser quantitativement les rapports entre les facteurs qui déterminent le développement spatial de l'aire vasculaire.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous nous sommes servi des œufs de White Leghorn provenant d'un seul lot de poules. Après 18 à 20 heures d'incubation les blastodermes sont prélevés et mis en culture *in vitro* selon une variante de la technique de New (Gallera & Nicolet 1961). La membrane vitelline est étalée sur un anneau de verre et un autre de diamètre plus grand est emboîté sur le premier pour tendre uniformément la membrane vitelline et la maintenir. Ensuite, les blastodermes sont dessinés à la chambre claire de Wild. Les blastodermes témoins sont remis directement à l'étuve et les autres sont opérés. Ces opérations consistent à découper le segment postérieur de l'aire opaque. La section transversale est faite à 0,4 mm en arrière du bord postérieur de l'aire pellucide. Dans la première série de nos expériences, le filtre millipore épais (140 $\mu$) est découpé en forme de demi-cercle et il est appliqué contre le bord de la blessure. Ce filtre se colle rapidement à l'ectoblaste et empêche la contraction du blastoderme sectionné. Dans la deuxième série, le filtre millipore a la forme d'un fer à cheval et, par conséquent, il n'adhère au blastoderme que des deux côtés de l'incision. Les blastodermes opérés sont dessinés de nouveau et remis à l'étuve. Le lendemain tous les blastodermes sont fixés au Bouin, colorés in toto à l'hémalun et montés dans le baume de Canada.

Les blastodermes que nous n'avons pas réussi à bien étaler sur le porte-objet ont été éliminés. Toutefois, dans le cas où les blastodermes opérés ont été fixés avec le millipore, nous n'avons pu éviter la formation d'un léger pli le long du bord de ce filtre. Les préparations in toto de tous nos blastodermes ont été dessinés. Les dessins ont été exécutés à l'agrandissement de 8,3 × et toujours dans les conditions rigoureusement identiques.

Ce ne sont pas les dimensions, elles-mêmes, mais leurs proportions qui nous intéressent. Les données numériques que nous allons examiner ont été prises sur les dessins. Les surfaces de nos dessins (blastodermes entiers et leurs aires vasculaires) ont été mesurées au planimètre à 1 mm² près. Pour « chiffrer » la forme générale du blastoderme et de l'aire vasculaire nous avons calculé leurs index, c'est-à-dire la longueur divisée par la largeur et multipliée par 100.

Bien que la marge de variation individuelle de nos mesures soit très large, elles se répartissent symétriquement par rapport à leur valeur moyenne et médiane. Par conséquent, nous avons pu soumettre nos données numériques à l'analyse statistique courante et basée entièrement sur la loi normale (distribution de Gauss).

Les blastodermes se rétrécissent considérablement au cours de leur fixation et surtout après leur montage dans le baume de Canada. Nous avons dessiné quelques-uns des blastodermes témoins juste avant leur fixation, ce qui nous a permis de calculer leur coefficient de rétrécissement. Il est constant et s'élève à 0,7 environ.

Le nombre de nos blastodermes est trop restreint pour tracer des courbes de fréquence. Nous avons donc rapporté directement les dimensions mesurées sur nos diagrammes. Les blastodermes sont allignés sur l'axe des *X*. L'intervalle entre les deux blastodermes est égal à la marge totale de variation divisée par le nombre des mesures.

Les dimensions de tous les blastodermes impaires dans la rangée sont portées sur les ordonnées. En reliant les points ainsi localisés, nous obtenons des lignes brisées qui visualisent l'amplitude de variation individuelle et permettent souvent de saisir directement les corrélations entre les diverses dimensions.

Afin de désigner le stade du développement atteint par les embryons nous nous référons aux tableaux de HAMBURGER & HAMILTON (1951).

## RÉSULTATS

A. — **Témoins.** Les 25 blastodermes témoins ont été mis en culture *in vitro* au stade 5, c'est-à-dire durant la période de la formation du prolongement céphalique. L'étalement de ces blastodermes sur la membrane vitelline a été très inégal, la surface du dessin du plus petit blastoderme est de 18 $cm^2$, tandis que celle du plus grand atteint 35 $cm^2$. $\Sigma X$, la somme des surfaces, est de 661 et $\Sigma x^2 = 18026,32$. Ces deux nombres suffisent pour calculer les paramètres de la distribution de nos mesures. L'écart type, indice de dispersion, s'élève à 4,78 et la moyenne à 26,44 ± 2,68. Les limites de confiance de la moyenne sont toujours calculées au seuil de probabilité $\alpha = 0,01$ d'après les tables du $t$ de Student. La surface du treizième blastoderme, qui occupe la position médiane dans notre rangée, est de 25,5, elle est donc largement incluse entre les limites de confiance de la moyenne.

Après 21 à 23 heures d'incubation les blastodermes ont été fixés et montés dans le baume de Canada (fig. 1). Leurs surfaces définitives ont été mesurées sur les dessins de nos préparations. Le rapport entre les mesures définitives et initiales, faites au début de la culture *in vitro*, est à peu près constante et s'élève en moyenne à 2,82 (1865,8: 661). Comme nous l'avons déjà indiqué, le coefficient de rétrécissement des blastodermes montés dans le baume de Canada est de 0,7.



FIG. 1.

Microphotographie *in toto* d'un blastoderme témoins. Agrandissement 4 ×.

L'agrandissement réel de nos blastodermes s'élève donc à $4X$ environ (2,82: 0,7). L'amplitude de variation individuelle est illustrée par la ligne brisée reproduite sur la figure 2. Cette ligne s'écarte peu de la droite tracée entre les valeurs extrêmes: 50 et 96. La moyenne est de 74,63 ± 6,87 ($\alpha = 0,01$). Les petites différences de l'accroissement de nos blastodermes s'expliquent par le fait que les embryons n'ont pas été tous fixée au même stade du développement. 8 ont été au stade 10, 11 au stade suivant et les 6 derniers ont atteint le stade 12. Désignons par $X$ le stade du développement et par $Y$ la surface du blastoderme. La corrélation entre ces deux variables est donnée par le coefficient de Bravais-Pearson. Il s'agit d'un quotient dont le numérateur est $\Sigma XY - \Sigma X \times \Sigma Y: N$ et le dénominateur est la racine carrée de l'expression suivante: $\{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2: N\} \times \{\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2: N\}$. Les calculs faits, nous obtenons $r = 0,614$. D'après la table des valeurs significatives de $r$, la pro-

babilité que ce coefficient ne correspond pas à une corrélation réelle est moindre que 0,01. En effet, les surfaces moyennes calculées pour les blastodermes aux stades 10, 11 et 12 sont: 65,5; 74,5 et 85,35.

L'étalement périphérique de l'aire vasculaire varie d'un cas à l'autre. Les surfaces des aires vasculaires sont enfermées entre 7,5 et 27,8 et leur surface moyenne s'élève à 16,74 ± 3,4. La marge de variation individuelle est donc relativement très large (fig. 2). Toutefois, les dimensions de l'aire vasculaire, pris dans leur ensemble, sont plus ou moins proportionnelles à celles des blastodermes entiers. Le coefficient de corrélation entre ces deux groupes des mesures est hautement significatif: $r = 0{,}747$, $\alpha = 0{,}01$.

La forme de l'aire vasculaire est soumise à de grandes variations. Les index de l'aire vasculaires (rapport entre la longueur et la largeur multipliée par 100) sont contenus entre 87 et 148. La valeur moyenne est de 116 ± 9,3. Malgré la large marge de variation aléatoire, les valeurs moyennes des index calculées pour les trois stades du développement, que nos blastodermes ont atteint, décroissent régulièrement: 122,4; 114,5 et 107. La fonction $y = 211{,}4 - 8{,}7 \times$, où la variable $X$ correspond à l'indicatif numérique du stade, exprime la régression trouvée. La corrélation négative entre l'index du blastoderme et le stade de son développement s'explique aisément. Au cours du développement normal l'aire vasculaire, tout d'abord allongée, s'arrondit progressivement.

Dans la culture *in vitro*, et malgré toutes les précautions prises, la membrane vitelline ne peut être aussi régulièrement tendue qu'elle est dans l'œuf. La forme de nos blastodermes s'écarte donc plus ou moins d'un cercle, mais ces légères variations aléatoires s'annulent mutuellement de sorte que la valeur moyenne des index est de 100,7.

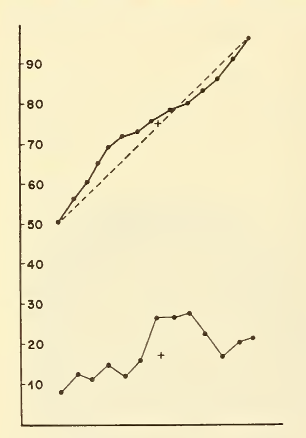



FIG. 2.

Les blastodermes témoins sont alignés sur l'axe des × et les dimensions de leurs surfaces et celles de l'aire vasculaire sont portées sur des ordonnées. La ligne brisée en haut de la figure représente les dimensions des blastodermes et la ligne au-dessous les dimensions des aires vasculaires. Les valeurs moyennes sont indiquées par les petites croix.

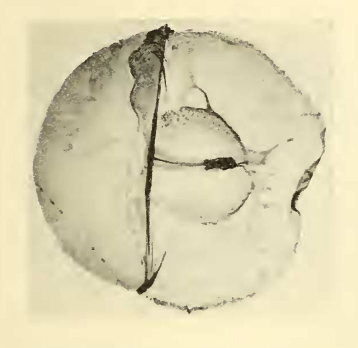
B. — **Résultats expérimentaux.** Les blastodermes amputés de la région postérieure de l'aire opaque, environ un cinquième du blastoderme, tendent à se contracter dans le sens céphalo-caudal.

*Série I* (25 expériences). Afin d'empêcher cette contraction, nous avons immobilisé le bord de la section. L'ectoblaste a été nettoyé du rempart vitellin le long de l'incision transversale et sur la largeur de 0,2 mm. Nous avons appliqué directement le filtre millipore sur la face interne de cette mince zone d'ectoblaste dénudé. Le filtre millipore, en adhérant étroitement à l'ectoblaste, empêche l'étalement du rempart vitellin, de l'aire vasculaire et de l'ectoblaste. Après 21 à 23 heures d'incubation, c'est-à-dire au moment de la fixation de nos blastodermes, la mince zone de l'ectoblaste étalé sur le millipore ne constitue en moyenne que 0,1 de la surface totale du blastoderme qui prend

alors la forme de la lune approchant de son dernier quartier (fig. 3). 18 blastodermes ont atteint le stade 11,4 le stade 10 et seulement 3 ont été fixés au stade 12. L'accroissement de leur surface a été un peu moindre que celui des témoins. $\Sigma X_2 : \Sigma X_1$ (1042: 438,35) = 2,4. tandis que ce rapport calculé pour les témoins s'élevait à 2,82. Les index de ces blastodermes ont été incluses entre 60 et 81 avec la moyenne de 69,8 ± 3,08.

La forme de l'aire vasculaire a été soumise à des variations individuelles beaucoup plus larges, contenues entre 71 et 123. La valeur moyenne de l'ensemble de nos mesures est de 94,6 ± 8,52, tandis que celle calculée pour les témoins est de 116,04. La différence entre ces deux moyennes est donc significative au seuil de probabilité $\alpha = 0{,}001$. Bien que la marge de variation individuelle de l'index de l'aire vasculaire soit très large, le coefficient de la corrélation entre leurs index et ceux des blastodermes entiers s'élève à 0,349. Nous avons donc 9 chances contre une que ce coefficient corresponde à une faible corrélation réelle.

L'extension périphérique de l'aire vasculaire variait aussi considérablement, leurs surfaces était contenues entre 3,5 et 14,7 avec la moyenne de 8,9 ± 1,8. Le coefficient de la corrélation entre les mesures des surfaces des blastodermes entiers et celles des surfaces de leurs aires vasculaires atteint 0,453 ($\alpha = 0{,}05$).



↑ Fig. 3. Fig. 4. →



Fig. 3.

Microphotographie *in toto* d'un blastoderme de la première série d'expériences. Agrandissement 4 ×.

Fig. 4.

Microphotographie d'un blastoderme de la deuxième série d'expériences. Agrandissement 4 ×.

*Série II* (18 expériences). Le filtre millipore, étant découpé en forme de fer à cheval, n'adhérait au blastoderme opéré que des deux côtés de l'incision transversale. Le bord de cette incision n'était donc retenu ni par le bord d'enveloppement ni par le millipore. Au cours de l'incubation il se rétractait, en dessinant une échancrure de plus en plus profonde (fig. 4).

Les blastodermes fixés après 21 à 23 heures d'incubation ont la forme d'un croissant plus ou moins régulier. La longueur de ces blastodermes (mesurée le long de l'axe de l'embryon) divisée par la largeur et multipliée par 100 nous donne l'index du blastoderme. Il varie entre 23 et 50, sa valeur moyenne est de 34,78 ± 4,2. L'aire vasculaire, en général un peu moins étirée dans le sens transversal, imite la forme du blastoderme. La corrélation entre l'élargissement excessif du blastoderme et celui de l'aire vasculaire, est évidente (fig. 5). Le coefficient de corrélation $r$ atteint 0,9.

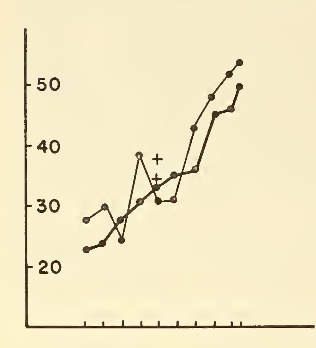



Fig. 5.

Diagramme représentant les variations individuelles des index des blastodermes (en traits épais) et de ceux des aires vasculaires (en traits minces). Les valeurs moyennes sont indiquées par les petites croix.

8 embryons ont été fixés au stade 11, 3 au stade 10 et 4 ont atteint le stade 12. Bien que le nombre de nos blastodermes soit restreint, la valeur moyenne des index de leurs aires vasculaires diminue d'un stade à l'autre: 42,94. 38.76, et 34.06. Vu la grande marge de variation individuelle, le coefficient de corrélation $r$ est peu élevé (− 0,33). En admettant que cette corrélation négative est réelle, nous pouvons l'exprimer par la fonction $y = 90{,}53 - 4{,}706 \times$ Nous obtenons: $y_1 = 42.66$, $y_2 = 39.76$ et $y_3 = 33.7$. Les différences entre les valeurs théoriques et les moyennes calculées pour les trois groupes de nos embryons sont minimes. Autrement dit, malgré la déformation profonde de l'aire vasculaire, son index dépend, comme chez les témoins, du stade atteint par l'embryon. En revanche, l'agrandissement de la surface des blastodermes opérés est moindre: $x_1 : x_2 = 1{,}99$.

## DISCUSSION

Les ailerons mésoblastiques commencent à dépasser les limites de l'aire pellucide au stade 5 et les contours de l'aire vasculaire deviennent visibles au stade 7. Etant donné que le mésoblaste extra-embryonnaire s'invagine le long de la moitié postérieure de la ligne primitive, l'aire vasculaire est d'abord allongée dans le sens céphalo-caudal. La ligne primitive et le sinus rhomboïde qui l'enclôt partiellement disparaissent au stade 10-11 et le bourgeon tronco-caudal commence à se constituer. A partir de ce moment, l'extension périphérique du mésoblaste extra-embryonnaire n'est due qu'à la prolifération de ses cellules et à leurs mouvements amiboïdes. Ces cellules sont reliées par de longs prolongements plasmatiques, de sorte qu'elles forment une nappe cellulaire cohérente qui tend à s'étaler uniformément dans toutes les directions. L'aire vasculaire s'arrondit donc de plus en plus. Nos embryons témoins ont montré que ce processus est très rapide: l'index moyen de l'aire vasculaire est de 124 au stade 10 et n'atteint que 107 au stade 12. Cependant, la marge de variation individuelle est beaucoup plus large chez les blastodermes cultivés *in vitro*. Rappelons qu'au moment de la mise en culture la membrane vitelline est détendue et ce n'est qu'au cours de l'incubation ultérieure qu'elle se colle à l'anneau de verre et se tend de nouveau.

En amputant le segment postérieur de l'aire opaque, nous avons détruit un tiers environ du bord d'enveloppement. Les blastodermes opérés se sont surtout développés en largeur, en particulier dans nos expériences de la deuxième série. L'index des blastodermes de la première série s'élevait à 69,8 et de la deuxième seulement à 38,4. Cette différence s'explique facilement: dans le premier cas le bord postérieur des blastodermes opérés était maintenu sur place par le filtre millipore, dans le deuxième cas nous avons laissé ce bord libre et le blastoderme a pu se contracter.

La déformation de l'aire vasculaire était toujours similaire à celle du blastoderme entier. Les valeurs moyennes des index de l'aire vasculaire étaient respectivement de 94,8 et de 37,7. Force est donc d'admettre que les mouvements des cellules du mésoblaste extra-embryonnaire s'orientent conformément à la répartition des tensions horizontales auxquelles est soumis le feuillet externe.

Si l'expansion périphérique du blastoderme est due à son bord d'enveloppement, l'augmentation de la surface de nos blastodermes opérés, surtout de ceux de la deuxième série, doit être moindre que celle des blastodermes témoins. En effet, l'accroissement périphérique des blastodermes de la première série n'atteint en moyenne que 85% de celui des témoins et 70% seulement, quand il s'agit de nos expériences de la deuxième série.

## Résumé

Les expériences sont pratiquées sur des blastodermes de poulet cultivés *in vitro*. Ils sont sectionnés transversalement 0,4 mm en arrière de l'aire pellucide et la région postérieure de l'aire opaque est enlevée. Le bord de la section est soit maintenu sur place par un fragment du filtre millipore soit laissé libre et détaché de la membrane vitelline. Les opérations sont faites au stade 4 et les blastodermes sont fixés 21 à 23 heures plus tard.

L'analyse statistique des blastodermes opérés et des témoins a démontré que l'accroissement périphérique et la forme du blastoderme et celle de l'aire vasculaire dépendent de la répartition vectorielle des tensions horizontales auxquelles le feuillet externe est soumis. Ces tensions sont dues à l'action du bord d'enveloppement qui glisse sur la membrane vitelline et étire le blastoderme.

## Zusammenfassung

Die Versuche wurden an *in vitro* gezüchteten Hühnchen-Keimscheiben ausgeführt. Diese wurden transversal 0,4 mm hinter der *Area pellucida* durchschnitten, und die hintere Region der *Area opaca* wurde entfernt. Der Schnittrand wurde entweder durch ein Fragment des Millipore-Filters an Ort festgehalten oder frei und von der Vitellinmembran unabhängig gelassen. Die Operationen wurden während des Stadiums 4 ausgeführt und die Keimscheiben 21 bis 23 Stunden später fixiert.

Die statistische Analyse der operierten Keimscheiben und des Vergleichsmaterials zeigt, dass das periphere Wachstum, sowie die Form der Keimscheibe und diejenige der *Area vasculosa*, von der vektoriellen Verteilung der horizontalen Spannungen abhängen, denen das äussere Keimblatt unterworfen ist.

## BIBLIOGRAPHIE

BELLAIRS, R. 1963. The yolk sac of the chick embryo studied by electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.* 11: 697-714.

— A. BOYDE, J.E.M. HEAYSMAN. 1969. The relationship between the edge of the chick blastoderm and the vitelline membrane. *Arch. Entwmech. Org.* 163: 113-121.

FOURGEAUD, C. et A. FUCHS. 1967. Statistique. *Collection universitaire de Mathématiques.* 24: 325. *Dunod, Paris.*

GALLERA, J. et E. OPRECHT. 1948. Sur la distribution des substances basophiles cytoplasmiques dans le blastoderme de la poule. *Revue suisse Zool.* 55: 243-250.

— G. NICOLET. 1961. Quelques commentaires sur les méthodes de culture in vitro de jeunes blastodermes de poulet. *Experientia* 17: 134.

HAMBURGER, V. et H.L. HAMILTON. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92.

NEW, D.A.T. 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J. Embryol. exp. Morph.* 3: 326-331.

— 1959. The adhensive properties and expansion of the chick blastoderm. *J. Embryol. exp. Morph.* 7: 146-164.

*Adresse de l'auteur :*

Institut d'Histologie et Embryologie générale
Laboratoire d'embryologie expérimentale
Université de Genève
CH-1211 Genève 4
Suisse